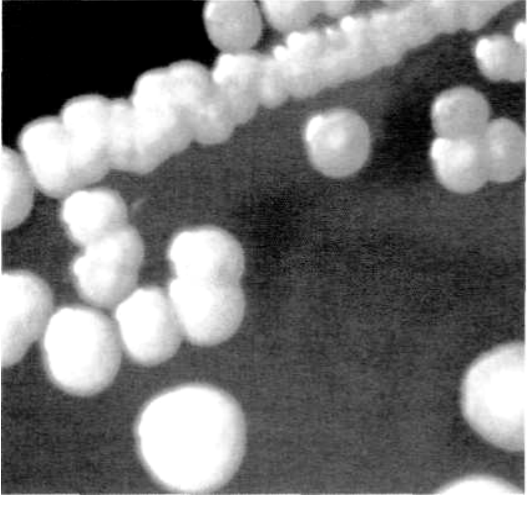
PARTE II

Nutrición, crecimiento y control microbiano

CAPÍTULO 5

Nutrición microbiana



Staphylococcus aureus forma grandes colonias doradas cuando se multiplica sobre agar sangre. Este patógeno humano produce enfermedades como furúnculos, abscesos, bacteriemia, endocarditis, intoxicaciones alimentarias, faringitis y neunomía.

índice

Conceptos

1. Los microorganismos celulares precisan de al menos 10 elementos en grandes cantidades, ya que se utilizarán para producir hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Otros elementos son necesarios en cantidades muy pequeñas y forman parte de enzimas y cofactores.
2. Todos los microorganismos celulares pueden clasificarse en algunas de las pocas categorías nutricionales que existen, en función de sus necesidades de carbono, energía y átomos de hidrógeno o electrones.
3. Las moléculas de nutrientes, con frecuencia, no pueden atravesar por difusión pasiva las membranas plasmáticas selectivamente permeables. En este caso, deben ser transportadas por uno de los tres mecanismos principales de transporte que comprenden la participación de proteínas transportadoras. Los microorganismos eucariotas emplean también la endoeitosis para captar nutrientes.
4. Los medios de cultivo son necesarios para cultivar los microorganismos en el laboratorio, y poder así realizar estudios característicos, como el análisis de agua y alimentos, y el aislamiento e identificación de microorganismos.
5. Los cultivos puros se pueden obtener mediante siembra en placa por extensión, en estrías o en profundidad, y son imprescindibles para estudiar las especies microbianas.

Toda la naturaleza es, como se ha dicho, una conjugación activa y pasiva del verbo comer.

William Ralph Inge.

Para obtener energía y elaborar nuevos componentes celulares, los organismos tienen que disponer de materias primas, o nutrientes. Los **nutrientes** son sustancias que se' emplean en la biosíntesis y producción de energía y, en consecuencia, son necesarios para el crecimiento microbiano. Este capítulo describe los requerimientos de nutrientes de los microorganismos, su forma de captación y el cultivo de los microorganismos.

Factores ambientales como temperatura, nivel de oxígeno y concentración osmótica del medio son críticos para cultivar con éxito los microorganismos. Estos temas se expondrán en el Capítulo 6, después de una introducción sobre el crecimiento microbiano.

5.1 Requerimientos nutritivos esenciales

El análisis de la composición de la célula microbiana revela que más del 95 % del peso seco de la célula está constituido por unos pocos elementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. Estos se denominan **macroelementos** o macronutrientes, porque los microorganismos los captan en cantidades relativamente grandes. Los seis primeros (C, O, H, N, S y P) son componentes de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los cuatro macroelementos restantes se encuentran en la célula en forma de cationes y desempeñan diversos papeles. Por ejemplo, el potasio (K^+) es necesario para la actividad de varias enzimas, incluyendo algunas que participan en la síntesis de proteínas. El calcio (Ca^{2+}) contribuye, entre otras funciones, a la termorresistencia de las endosporas. El magnesio (Mg^{2+}) actúa como cofactor de muchas enzimas, forma complejos con el ATP, y estabiliza los ribosomas y las membranas celulares. El hierro (Fe^{2+} y Fe^+) forma parte de los citocromos y es cofactor de enzimas y de proteínas transportadoras de electrones.

Todos los organismos, incluidos los microorganismos, requieren diversos **micronutrientes** o **elementos traza,** además de los macroelementos. La mayoría de las células necesitan los micronutrientes: manganeso, cinc, cobalto, molibdeno, níquel y cobre. Sin embargo, las células precisan de unas cantidades tan pequeñas, que contaminantes presentes en el agua, recipientes y en los componentes habituales del medio son a menudo suficientes para el crecimiento. Por ello, es muy difícil demostrar la necesidad de un micronutriente. En la naturaleza, los micronutrientes son ubicuotas y probablemente, por lo general, no limiten el crecimiento. Estos micronutrientes son normalmente parte de enzimas y cofactores, y facilitan la catálisis de reacciones y el mantenimiento de la estructura de proteínas. Por ejemplo, el cinc (Zn^{2+}) se encuentra en el centro activo de algunas enzimas, pero también está invoucrado en la asociación de las subunidades reguladoras y catalíticas de la aspartato carbamoiltransferasa en *E. coli {véase la sección 8.9).* El manganeso (Mn^{2+}) facilita a muchas enzimas la transferencia catalítica de los grupos fosfato. El molibdeno (Mo^{2+}) es necesario para fijar nitrógeno; y el cobalto (Co^{2+}) es un componente de la vitamina B_{t2}. Enzimas y transportadores de electrones (pp. 168-175).

Además de los macroelementos comunes y elementos traza, los microorganismos pueden tener necesidades especiales que reflejen la naturaleza especial de su morfología o de su habitat natural. Las diatomeas *{véase la Figura 26.6c,d)* necesitan ácido silícico (H_4SiO_4) para construir sus hermosas paredes celulares de sílice [(SiC^),,]. Aunque la mayoría de las bacterias no requieren grandes cantidades de sodio, muchas bacterias que crecen en lagos salinos y océanos *{véanse las pp. 130, 497)* dependen de la presencia de concentraciones elevadas del ion sodio (Na^+).

Por último, debe recalcarse que los microorganismos requieren una mezcla compensada de nutrientes. Si un nutriente esencial no se encuentra disponible, el crecimiento microbiano se verá limitado, independientemente de la concentración de otros nutrientes.

5.2 Requerimientos de carbono, hidrógeno *y* oxígeno

Las necesidades de carbono, hidrógeno y oxígeno suelen cubrirse al mismo tiempo. El carbono es necesario para construir el esqueleto de todas las moléculas orgánicas y, además, las moléculas que sirven como fuente de carbono aportan también, normalmente, átomos de oxígeno e hidrógeno. Es decir, los compuestos de carbono constituyen la fuente de los tres elementos. Por otra parte, ya que estos compuestos orgánicos se encuentran casi siempre reducidos y pueden donar esos electrones a otras moléculas, pueden servir como fuentes de energía. Así, cuanto más reducidos estén, mayor contenido energético tendrán (p. ej., los lípidos tienen un mayor contenido energético que los carbohidratos). Esto es así porque, como veremos más adelante, la transferencia de electrones libera energía cuando los electrones se mueven de dadores reducidos (con un potencial de reducción más negativo) a aceptores oxidados (más electropositivos). En definitiva, las fuentes de carbono frecuentemente se utilizan además como fuentes de energía, aunque ésta no fuera su utilidad inicial. Reacciones de óxido-reducción y energía (pp. 168-170).

Una fuente de carbono muy importante que no aporta hidrógeno o energía es el dióxido de carbono (CO_2). Esto es así porque el CO_2 está oxidado y carece de hidrógeno. Probablemente, todos los organismos pueden fijar CO_2 —esto

es, reducirlo y transformarlo en moléculas orgánicas—. Sin embargo, por definición, sólo los organismos **autotrofos** pueden usar CO_2 como fuente única o principal de carbono. Numerosos microorganismos son autotrofos, y la mayoría de éstos son fotosintéticos, y utilizan la luz como fuente de energía. Algunos autotrofos oxidan moléculas inorgánicas y obtenien energía al ceder esos electrones. Fijación fotosintética del dióxido de carbono (p. 223).

La reducción del CO_2 es un proceso que consume gran cantidad de energía. Por ello, muchos microorganismos no pueden usar CO_2 como única fuente de carbono, sino que dependen de la presencia de moléculas complejas, más reducidas, como fuente de carbono. Los organismos que emplean moléculas orgánicas preformadas y reducidas como fuentes de carbono son **heterotrofos** (estas moléculas preformadas proceden generalmente de otros organismos). Como se indicó anteriormente, la mayoría de los heterotrofos usan nutrientes orgánicos como fuente de carbono y de energía. Por ejemplo, la vía glucolítica produce energía en forma de ATP y NADH, y también compuestos carbonados reducidos para utilizarlos en la biosíntesis. Vía glucolítica (p. 189).

La característica nutricional más notable de los microorganismos es su extraordinaria flexibilidad en relación con las fuentes de carbono. Experimentos de laboratorio indican que no existe ninguna molécula orgánica natural que no pueda ser utilizada por algún microorganismo. Los actinomicetos pueden degradar alcohol amílico, parafina e incluso caucho. Algunas bacterias pueden emplear casi cualquier sustancia como fuente de carbono; por ejemplo, *Burkholderia cepacia* puede utilizar más de 100 compuestos diferentes de carbono. En contraste con estas bacterias «omnívoras», otras son extremadamente exigentes y catabolizan pocos compuestos de carbono. Así, las bacterias metilotrofas metabolizan sólo metano, metanol, monóxido de carbono, ácido fórmico y similares moléculas de un átomo de carbono. *Leptospira* utiliza solamente ácidos grasos de cadena larga como fuente principal de carbono y energía.

Parece ser que en los entornos naturales poblaciones muy complejas de microorganismos son capaces incluso de metabolizar sustancias sintetizadas por el hombre, como por ejemplo los pesticidas. Moléculas en principio indigestibles son oxidadas y degradadas en presencia de un nutriente que favorece el crecimiento y que es metabolizado al mismo tiempo, proceso denominado cometabolismo. Los productos resultantes de este proceso pueden ser utilizados como nutrientes por otros microorganismos. Biodegradación y microorganismos (pp. 1095-1100).

5.3 Tipos nutricionales entre los micoorganisrnos

Además de los requerimientos de carbono, hidrógeno y oxígeno, todos los organismos necesitan fuentes de energía y electrones para su crecimiento. Los microorganismos pueden agruparse en clases nutricionales basadas en cómo satisfacen dichos requerimientos **(Tabla 5.1).** Ya hemos visto que los microorganismos pueden clasificarse en heterotrofos o autotrofos con respecto a su fuente preferente de carbono. Por otra parte, existen únicamente dos fuentes de energía disponibles para los organismos: 1) la energía lumínica para la fotosíntesis, y 2) la energía derivada de la oxidación de moléculas orgánicas o inorgánicas. Los **fototrofos** emplean luz como fuente de energía; los **quimiotrofos** obtienen la energía a partir de la oxidación de compuestos químicos (orgánicos o inorgánicos). También, los microorganismos tienen solamente dos fuentes de átomos de hidrógeno, o electrones. Los **litotrofos** (esto es, «que comen piedras») utilizan sustancias inorgánicas reducidas como fuente de electrones, mientras que los **organotrofos** obtienen electrones o hidrógeno de compuestos orgánicos. Fase lumínica de la fotosíntesis (pp. 209-215); Oxidación de moléculas orgánicas e inorgánicas (pp. 188-209).

A pesar de la enorme diversidad metabólica que presentan los microorganismos, la mayoría puede incluirse en una de los cuatro tipos nutricionales, tomando como base sus fuentes primarias de energía, hidrógeno o electrones, o ambos, y carbono **(Tabla 5.2).** La inmensa mayoría de los microorganismos estudiados hasta la fecha son autotrofos fotolitotróficos o heterotrofos quimioorganotróficos. Los **autotrofos fotolitotróficos** (denominados a menudo **fotoautotrofos** o fotolitoautotrofos) utilizan energía lumínica y CO_2 como fuente de carbono. Las algas y las cianobacterias emplean agua como dador de electrones, liberando el oxígeno. Las bacterias verdes y púrpuras del azufre no pueden oxidar agua, pero captan electrones de dadores inorgánicos, como hidrógeno, sulfuro de hidrógeno y azufre elemental. Los **heterotrofos quimioorganotróficos** (denominados a menudo **quimioheterotrofos,** quimioorganoheterotrofos o, incluso, simplemente heterotrofos) emplean compuestos

Tabla 5.1 Fuentes de carbono, energía y electrones

Fuentes de carbono	
Autotrofos	CO_2 como única o principal fuente de carbono *(p. 223)"*
Heterotrofos	Moléculas orgánicas preformadas reducidas, procedentes de otros organismos *{Capítulos 9 y 10)*
Fuentes de energía	
Fototrofos	Luz *(pp. 209-215)*
Quimiotrofos	Oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos *(Capítulo 9)*
Fuentes de electrones	
Litotrofos	Moléculas inorgánicas reducidas *(pp. 206-209)*
Organotrofos	Moléculas orgánicas *(Capítulo 9).*

* Para cada categoría se indica entre paréntesis las páginas o el capítulo donde se describen las vías metabólicas que participan en el proceso.

Tabla 5.2 Principales tipos nutricionalcs entre los microorganismos

Principales tipos nutricionalcs"	Fuentes de energía, hidrógeno/electrones \ carbono	Microorganismos representativos
Fotolitotrofía autotrófica (fotolitoautotrofía)	Energía lumínica Dador inorgánico de hidrógeno/electrones (H/e~) CO_2 como fuente de carbono	Algas Bacterias púrpuras y verdes del azufre Cianobacterias
Fotoorganotrofía heterotrófica (fotoorganoheterotrofía)	Energía lumínica Dador orgánico de H/e~ Fuente orgánica de carbono (puede emplearse también CO_2)	Bacterias púrpuras no sulfúreas Bacterias verdes no sulfúreas
Quimiolitotrofía autotrófica (quimiolitoautotrofía)	Fuente de energía química (inorgánica) Dador inorgánico de H/e~ CO_2 como fuente de carbono	Bacterias oxidantes del azufre Bacterias del hidrógeno Bacterias nitrificantes Bacterias oxidantes del hierro
Quimioorganotrofía heterotrófica (quimioorganoheterotrofía)	Fuente de energía química (orgánica) Dador orgánico de H/e~ Fuente orgánica de carbono	Protozoos Hongos La mayoría de las bacterias no fotosintéticas (incluyendo la mayor parte de los microorganismos patógenos)

[a] Se han aislado bacterias que pertenecen a otras categorías nutricionales. Los tipos descritos se basan en las fuentes de energía, electrones y carbono. Entre paréntesis se indica el nombre abreviado.

orgánicos como fuentes de energía, hidrógeno, electrones y carbono para realizar la biosíntesis. Con frecuencia, un mismo nutriente orgánico satisface todas estas necesidades. Es interesante destacar que prácticamente todos los microorganismos patógenos son quimioheterotrofos.

Las otras dos clases comprenden pocos microorganismos, pero son a menudo muy importantes desde el punto de vista ecológico. Algunas bacterias púrpuras y verdes son fotosintéticas y utilizan materia orgánica como dador de electrones y fuente de carbono. Estos organismos **heterotrofos fotoorganotrófícos** (fotoorganoheterotrofos) habitan comúnmente lagos y arroyos contaminados. Algunas de estas bacterias pueden crecer también como fotoautotrofos, teniendo como dador de electrones al hidrógeno molecular. Los miembros del cuarto grupo, los **autotrofos quimiolitotróficos** (quimiolitoautotrofos) oxidan compuestos inorgánicos reducidos, como moléculas de hierro, nitrógeno o azufre para liberar energía y electrones para la biosíntesis. El dióxido de carbono es la fuente de carbono. Unos pocos quimiolitotrofos pueden obtener el carbono de fuentes orgánicas y, por ello, son heterotrofos. Los quimiolitotrofos contribuyen en gran medida a las transformaciones químicas de los elementos (p. ej., la conversión de amonio en nitrato, o de azufre en sulfato) que se producen continuamente en el ecosistema. Bacterias fotosintéticas y quimiolitotrofas (secciones 21.3, 22.1 y 22.3).

Aunque una especie particular puede pertenecer solamente a uno de los cuatro tipos nutricionales mencionados, algunas muestran una gran flexibilidad metabólica y modifican sus modelos metabólicos para adaptarse a los cambios ambientales. Por ejemplo, muchas bacterias púrpuras no sulfúreas *{véase la sección* 22.7) se comportan como heterotrofas fotoorganotrofas en ausencia de oxígeno, pero oxidan moléculas orgánicas y funcionan quimiotróficamente en presencia de niveles atmosféricos de oxígeno. Incluso, cuando hay poco oxígeno, la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo pueden funcionar simultáneamente. Otro ejemplo lo proporcionan bacterias como *Beggiatoa {véase la p. 539)* que pueden obtener energía de fuentes inorgánicas, utilizando una fuente orgánica de carbono (aunque a veces puede ser el propio CO_2). A estos microorganismos se les denomina habitualmente **mixotrólícos,** ya que combinan procesos metabólicos quimiolitoautotróficos y heterotróficos. Esta clase de flexibilidad parece compleja y confusa, pero aporta al organismo en cuestión una gran ventaja adaptativa cuando las condiciones ambientales cambian con frecuencia.

1. ¿Qué son los nutrientes y por qué motivos se dividen en macroelementos y elementos traza? Describa cómo utiliza un organismo los macronutrientes y los elementos traza.
2. Defina autotrofo y heterotrofo.
3. Exponga los fundamentos para clasificar los microorganismos en función de sus necesidades de energía, hidrógeno y electrones.
4. Describa los requerimientos nutricionales de los cuatro grupos principales y aporte algunos ejemplos microbianos de cada uno de ellos. ¿Qué es un microorganismo mixotrofo?

5.4 Necesidades de nitrógeno, fósforo y azufre

Para crecer, un microorganismo debe ser capaz de incorporar grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y azufre. Aunque

estos elementos pueden adquirirse a partir de los mismos nutrientes que aportan carbono, los microorganismos suelen emplear también fuentes inorgánicas. Mecanismos bioquímicos para incorporar nitrógeno, fósforo y azufre (pp. 225-230).

El nitrógeno es necesario para sintetizar aminoácidos, purinas, pirimidinas, algunos hidratos de carbono y lípidos, cofactores de enzimas y otras sustancias. Muchos microorganismos pueden emplear el nitrógeno en aminoácidos y, a menudo, incorporar directamente el amonio por medio de enzimas, como glutamato deshidrogenasa o glutamina sintetasa y glutamato sintetasa *(véase la sección 10.4).* La mayoría de los microorganismos fototrofos y muchos no fotosintéticos reducen nitrato a amonio, incorporándolo mediante la reducción asimilatoria de nitrato *{véanse las pp. 226-227).* Numerosas bacterias (p. ej., muchas cianobacterias y la bacteria simbiótica *Rhizobium)* pueden reducir y asimilar el nitrógeno atmosférico mediante el sistema de la nitrogenasa *{véase la sección 10.4).*

El fósforo está presente en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos como ATP, varios cofactores, algunas proteínas y otros componentes celulares. Casi todos los microorganismos usan fosfato inorgánico como fuente de fósforo y lo incorporan directamente. Niveles bajos de fosfato limitan el crecimiento microbiano en numerosos entornos acuáticos. La captación de fósforo por *E. coli* ha sido muy estudiada. Esta bacteria puede utilizar tanto fósforo orgánico como inorgánico. Algunos organofosfatados como las hexosas 6-fosfato pueden ser tomados directamente mediante proteínas transportadoras. Otros organofosfatados deben ser hidrolizados en el periplasma por fosfatasas alcalinas para producir fosfato inorgánico, que será entones transportado a través de la membrana citoplasmática. Cuando el fosfato inorgánico se encuentra fuera de la célula, ésta cruza la membrana externa a través de una porina. Posteriormente, un sistema de transporte la lleva a través de la membrana citoplasmática. A altas concentraciones de fosfato, el sistema de transporte más utilizado es, probablemente, el Pit. Cuando la concentración de fosfato es baja, se utiliza el PST (transporte específico de fosfato). El sistema PST tiene mayor afinidad por el fosfato; se trata de un sistema ABC *(véanse las pp. 106-107)* y utiliza proteínas periplásmicas.

El azufre es necesario para la síntesis de sustancias como los aminoácidos cisteína y metionina, algunos hidratos de carbono, biotina y tiamina. La mayoría de los microorganismos utilizan sulfato como fuente de azufre y lo reducen mediante la reducción asimilatoria de sulfato *(véase sección 10.4);* unos pocos precisan de una forma reducida de azufre, como cisteína.

5.5 Factores de crecimiento

Normalmente, los microorganismos podrán crecer y multiplicarse cuando dispongan de fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Estos organismos tienen las enzimas y vías necesarias para sintetizar todos los componentes celulares que precisan para su mantenimiento adecuado; sin embargo, muchos microorganismos carecen de una o más enzimas esenciales. Por ello, no pueden elaborar todos los constituyentes indispensables, sino que deben obtenerlos, o a sus precursores, del ambiente. Los compuestos orgánicos que son necesarios porque son componentes celulares esenciales, o sus precursores, y no pueden sintetizarse por el organismo, se denominan **factores de crecimiento.** Existen tres clases principales de factores de crecimiento: 1) aminoácidos, 2) purinas y pirimidinas, y 3) vitaminas. Los aminoácidos se necesitan para la síntesis de proteínas, y las purinas y pirimidinas, para la síntesis de ácidos nucleicos. Las **vitaminas** son moléculas orgánicas pequeñas que normalmente forman la totalidad o parte de los cofactores enzimáticos *(véase la sección 8.6)* y sólo se requieren cantidades pequeñas para el crecimiento. Las funciones de algunas vitaminas seleccionadas y ejemplos de microorganismos que las precisan se exponen en la **Tabla 5.3.** Algunos microorganismos necesitan muchas vitaminas; por ejemplo, *Enterococcus faecalis* (bacteria acidoláctica) necesita ocho vitaminas diferentes para crecer. También se observan otros factores de crecimiento; *Haemophilus influenzae* necesita el grupo hemo (de la hemoglobina o de citocromos), y algunos micoplasmas requieren colesterol.

El conocimiento de las necesidades de factores de crecimiento específicos permite realizar bioensayos de crecimiento-respuesta frente a numerosas sustancias. Por ejemplo, especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* pueden utilizarse en bioensayos para determinar la presencia de la mayoría de vitaminas y aminoácidos. Se cultiva la bacteria apropiada en una serie de tubos de cultivo, cada uno de los cuales contiene un medio con una cantidad en exceso de todos los componentes necesarios, excepto del factor de crecimiento que se va a ensayar. Se añade una cantidad diferente de factor de crecimiento en cada tubo. Se traza una curva estándar, relacionando la cantidad o concentración de un factor de crecimiento con el nivel total de crecimiento bacteriano. Idealmente, el nivel de crecimiento resultante es directamente proporcional a la concentración del factor de crecimiento presente; si el factor de crecimiento se duplica, lo hace también el nivel final de crecimiento bacteriano. La concentración del factor de crecimiento en la muestra de ensayo se determina extrapolando el nivel de crecimiento producido en la muestra desconocida con el originado en las estándares. Los bioensayos microbiológicos son específicos, sensibles y sencillos. Todavía se emplean para cuantificar sustancias como la vitamina B_{12} y la biotina, a pesar de los avances en las técnicas químicas de ensayos.

La observación de que numerosos microorganismos pueden sintetizar grandes cantidades de vitaminas ha permitido su empleo en la industria. Diversas vitaminas hidrofílicas o hidrofóbicas se producen parcial o totalmente en grandes incubadores industriales. Algunos ejemplos representativos de tales vitaminas y de los microorganismos que las sintetizan son: riboflavina *(Clostridium, Candida, Ashbya, Eremothe-*

Tabla 5.3 Funciones de algunas vitaminas comunes en los microorganismos

Vitamina	Funciones	Ejemplos de microorganismos que requieren vitaminas"
Biotina Cianocobalamina	Carboxilación (fijación de CO_2) Metabolismo de compuestos monocarbonados	*Leuconostoc mesenteroides* (B) *Saccharomyces cerevisiae* (H) *Ochmmonas malhamensis* (A) *Acanthamoeba castellana* (P)
(B12)	Reagrupamientos moleculares Metabolismo de compuestos monocarbonados: transporta grupos metilo	Especies de *Lactobacillus* (B) *Euglena gracilis* (A) Diatomeas y otras muchas algas (A) *Acanthamoeba castellana* (P)
Ácido fólico Ácido	Metabolismo de compuestos monocarbonados	*Enterococcus faecalis* (B) *Tetrahymena pyriformis* (P)
lipoico Ácido pantoténico	Transferencia de grupos acilo	*Lactobacillus casei* (B) Especies de *Tetrahymena* (P)
	Precursor de la coenzima A: transporta grupos acilo (oxidación del piruvato, metabolismo de los ácidos grasos)	*Proteus morganii* (B) Especies de *Hanseniaspora* (H) Especies de *Paramecium* (P)
Piridoxina (Be)	Metabolismo de los aminoácidos (p. ej., transaminación)	Especies de *Lactobacillus* (B) *Tetrahymena pyriformis* (P)
Niacina (ácido nicotínico)	Precursor de NAD y NADP: transporta electrones y átomos de hidrógeno	*Brucella abortas, Haemophilus influenzae* (B) *Blastocladia pringsheimü* (H) *Crithidia fasciculata* (P)
Riboflavina (B_2)	Precursor de FAD y FMN: transporta electrones o átomos de hidrógeno	*Caulobacter vibrioides* (B) Especies de *Dictyostelium* (H) *Tetrahymena pyriformis* (P)
Tiamina (B,)	Transferencia de grupos aldehido (decarboxilación del piruvato, oxidación ot-ceto acida	*Bacillus anthracis* (B) *Phycomyces blakesleeanus* (H) *Ochromonas malhamensis* (A) *Colpidium campylum* (P)

Los microorganismos representativos son miembros de los siguientes grupos: bacterias (B), hongos (H), algas (A) y protozoos (P).

cium); coenzima A *(Brevibacterium);* vitamina B_{12} *(Streptomyees, Propionibacterium, Pseudomonas);* vitamina C *(Gluconobacter, Erwinia, Corynebacterium);* ß-caroteno *(Dunaliella);* y vitamina D *(Saccharomyces).* La investigación actual se centra en la mejora de los rendimientos y en encontrar microorganismos que sean capaces de producir grandes cantidades de otras vitaminas.

Resuma brevemente las formas en que los microorganismos obtienen de su entorno natural nitrógeno, fósforo y azufre.

¿Qué son los factores de crecimiento? ¿Qué son las vitaminas? ¿Cómo se pueden emplear los microorganismos para determinar la cantidad de una sustancia específica en una muestra?

5.6 Captación celular de nutrientes

El primer paso en la utilización de un nutriente consiste en su captación por la célula. Los mecanismos de captación deben ser específicos —esto es, hay que tomar las sustancias necesarias y no otras—. No es útil para una célula captar una sustancia que no puede utilizar. Como los microorganismos viven a menudo en habitat pobres en nutrientes, deben ser capaces de transportarlos en contra de un gradiente de concentración, desde soluciones diluidas hasta el interior de la célula. Finalmente, las moléculas de nutrientes tienen que atravesar la membrana plasmática selectivamente permeable, que no permitirá el paso libre a la mayoría de las sustancias. Considerando la gran variedad de nutrientes existentes y la complejidad del proceso de nutrición celular, no resulta sorprendente que los microorganismos utilicen varios mecanismos de transporte diferentes. Los más importantes son la difusión facilitada, el transporte activo y la translocación de grupo. Se cree que los microorganismos eucariotas no utilizan la translocación de grupo, sino que captan los nutrientes por endocitosis *(véase la sección 4.5).* Estructura y propiedades de la membrana plasmática (pp. 48-51).

Difusión facilitada

Algunas sustancias, como el glicerol, pueden atravesar la membrana plasmática por **difusión pasiva.** La difusión pasiva, denominada a menudo simplemente difusión, es el pro-

ceso por el cual las moléculas se desplazan desde una región de concentración elevada a otra con menor concentración, debido a una agitación térmica aleatoria. El nivel de difusión pasiva depende de la diferencia de gradiente de concentración entre el exterior de la célula y su interior **(Figura 5.1).** Es necesario un gradiente de concentración bastante elevado para que se realice una captación de nutrientes adecuada por difusión pasiva (esto es, la concentración externa del nutriente debe ser alta), disminuyendo el nivel de captación a medida que se adquiere más nutriente, salvo que éste se utilice inmediatamente. Moléculas muy pequeñas como H_2O, O_2 y CO_2 atraviesan a menudo las membranas por difusión pasiva. Grandes moléculas, iones y sustancia polares no atraviesan las membranas por difusión pasiva.

El nivel de difusión a través de las membranas selectivamente permeables aumenta considerablemente cuando intervienen proteínas transportadoras, denominadas **permeasas,** que están inmersas en la membrana plasmática. Como el transportador facilita el proceso de difusión, éste se denomina **difusión facilitada.** La velocidad o tasa efectora en la difusión facilitada también aumenta con el gradiente, pero lo hace mucho más rápidamente que en la difusión pasiva, y a concentraciones inferiores de la molécula que difunde (Figura 5.1). Obsérvese que el nivel de difusión alcanza una meseta por encima de un valor de gradiente específico, debido a la saturación del transportador —esto es, la proteína transportadora se une y traslada tantas moléculas de soluto como sea posible—. La curva resultante es similar a una curva enzima-sustrato *(véase la sección 8.6)* y diferente de la respuesta lineal observada en la difusión pasiva. Las proteínas transportadoras se parecen también a las enzimas en su especificidad por la sustancia que transportan; cada una es selectiva de una sustancia y sólo transportará solutos muy similares. Aunque en este proceso participa una proteína transportadora, se trata de una auténtica difusión. El movimiento de las moléculas no necesita un aporte adicional de energía, está dirigido por un gradiente de concentración en toda la membrana. Si desaparece el gradiente de concentración, el movimiento neto hacia el interior se detiene. El gradiente puede ser mantenido mediante la transformación del nutriente transportado en otro compuesto, o bien, en el caso de eucariotas, transportándolo a otro compartimiento intracelular. Curiosamente, algunas de estas proteínas transportadoras están relacionadas con las proteínas de las lentes oculares de mamíferos perteneciendo a la familia de las proteínas MIP. Las dos MIP más utilizadas en bacterias son acuaporinas, que transportan agua y otras sustancias facilitadoras de la difusión de glicerol.

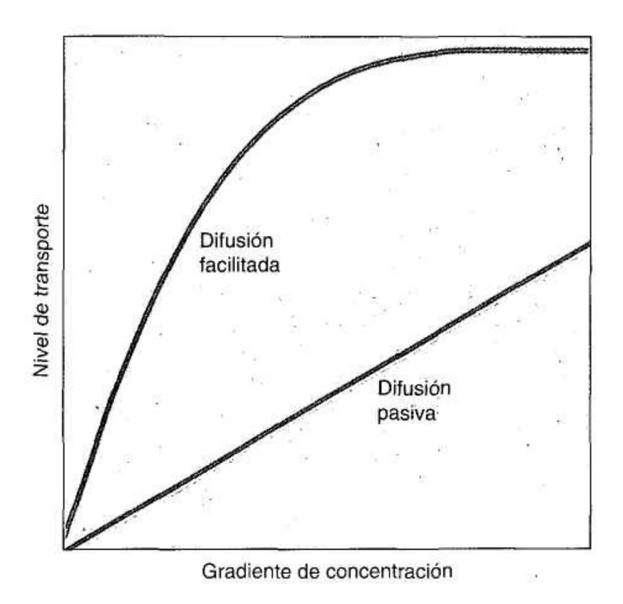


Figura 5.1 Difusión pasiva y facilitada. El nivel de difusión depende de la diferencia de gradiente de concentración del soluto. Obsérvese que cuando está funcionando un transportador de difusión facilitada, se produce un efecto de saturación o meseta por encima de un valor específico de gradiente. Dicho efecto de saturación se observa siempre que una proteína transportadora medie en el proceso.

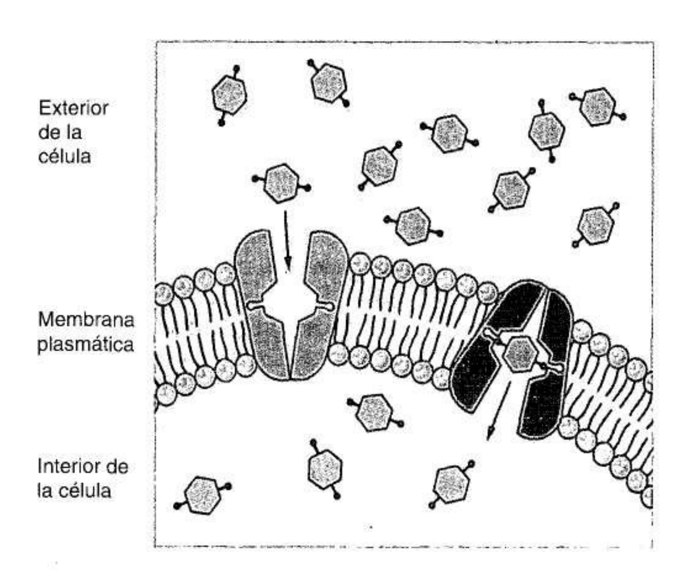


Figura 5.2 Modelo de difusión facilitada. El transportador de membrana puede cambiar su conformación después de unirse a un soluto, liberándolo posteriormente al interior de la célula. Luego, recupera su conformación original, orientado hacia el exterior, quedando listo para captar otra molécula de soluto. Como no hay aporte de energía, las moléculas continuarán entrando en la célula mientras que su concentración sea superior a la del exterior.

Aunque se han realizado muchas investigaciones sobre el mecanismo de difusión facilitada, este proceso no se conoce todavía completamente. Parece que el complejo de proteína transportadora cruza toda la membrana **(Figura 5.2).** Una vez que la molécula de soluto se une por el exterior, el complejo transportador puede cambiar su conformación y liberar la molécula en el interior de la célula. A continuación, volverá a adquirir su forma original, quedando listo para captar otra molécula. El efecto neto es que una molécula no liposoluble puede penetrar en la célula debido a su gradiente de concentración. Recuérdese que este mecanismo es dependiente de gradientes de concentración y, por tanto,

reversible. Si la concentración del soluto es superior dentro de la célula, se desplazará hacia el exterior. Como la célula metaboliza los nutrientes entrantes, está favorecida la entrada a la célula.

La difusión facilitada no parece que sea importante en los procariotas, ya que la concentración de nutrientes normalmente es más baja fuera de la célula. El glicerol se transporta por difusión facilitada en *E. coli, Salmonella typhimurium, Pseudomonas, Bacillus* y otras bacterias. Este proceso es mucho más destacado en las células eucariotas, que lo utilizan para transportar diversos azúcares y aminoácidos.

Transporte activo

Aunque los transportadores de la difusión facilitada pueden desplazar eficazmente moléculas al interior celular cuando la concentración del soluto es superior en el exterior, no pueden transportar solutos cuya concentración sea superior dentro de la célula (esto es, en contra de un gradiente de concentración). Los microorganismos viven a menudo en habitat caracterizados por poseer fuentes de nutrientes muy diluidas, por lo que tienen que transportarlos y concentrarlos para poder desarrollarse. Por ello, los mecanismos de difusión facilitada no son siempre adecuados y la célula debe utilizar otros métodos. Los dos procesos de transporte más importantes para estas situaciones son el transporte activo y la translocación de grupo.

El **transporte activo** permite el transporte de moléculas de soluto hacia concentraciones más elevadas, o en contra de un gradiente de concentración, utilizando un aporte de energía metabólica. Como el transporte activo comprende la actividad de un transportador proteico, se parece en algunos aspectos a la difusión facilitada. Las proteínas transportadoras o permeasas se unen a determinados solutos con una gran especificidad por las moléculas que transportan. En ambos sistemas, difusión facilitada y transporte activo, moléculas de soluto similares pueden competir por la misma proteína transportadora. El transporte activo se caracteriza también por el efecto de saturación del transportador en concentraciones de soluto elevadas (Figura 5.1). Sin embargo, el transporte activo se diferencia de la difusión facilitada por el uso de energía metabólica y su capacidad de concentrar sustancias. Los inhibidores metabólicos que bloquean la producción de energía inhibirán el transporte activo, pero no afectarán a la difusión facilitada (al menos, por un período corto de tiempo).

Los sistemas de transporte mediados por proteínas o **ATP-ligado (ATP-£inding cassette, por ello denominados, transportadores ABC),** se encuentran en bacterias, archaea y eucariotas. Normalmente, estos transportadores consisten en dos dominios proteicos hidrofóbicos transmembrana, y dos dominios en el citoplasma que pueden unirse a ATP **(Figura 5.3).** Los dominios transmembrana forman un poro, y los otros dos citoplásmicos puede ligar e hidrolizar ATP para facilitar el transporte. Además, estos transportadores ABC emplean a otras proteínas que serán quienes capten específicamente los solutos que serán transportados *{véase la Figura 3.23).* Estas proteínas especiales se encuentran en el periplasma de bacterias Gram negativas, o bien unidas a los lípidos de la cara externa de la membrana citioplasmática de bacterias Gram positivas. Una vez captados los solutos, estas proteínas interactúan con los transportadores ABC, dominios hidrófobos, liberando entonces el soluto que pasará a través del poro. Además de esta función, las proteínas de captación de solutos participan en la quimiotaxis *{véanse las pp. 70-72).* Mediante este mecanismo, *E. coli* transporta una gran variedad de azúcares (arabinosa, maltosa, galactosa, ribosa) y aminoácidos (glutamato, histidina, leucina).

En bacterias Gram negativas, los solutos deben atravesar antes la membrana externa, requiriéndose otros sistemas de transporte activo. Esto se puede llevar a cabo mediante diferentes mecanismos. Cuando la sustancia es pequeña, pueden utilizarse proteínas genéricas como las porinas OmpF *{véase la p. 63);* grandes moléculas requieren porinas especializadas. En algunos casos (p. ej., transporte de hierro y vitamina Bi_2), se requieren receptores y transportadores de membrana externa de muy alta afinidad.

En eucariotas, los transportadores ABC pueden tener un gran interés médico. Algunas células tumorales evitan la acción de ciertos fármacos bombeándolos al exterior mediante estos transportadores. La fibrosis quística puede derivar de una mutación que inactiva un transportador ABC que actúa como canal del ion cloro en los pulmones.

Las bacterias utilizan también el gradiente de protones generado durante el transporte de electrones para facilitar el

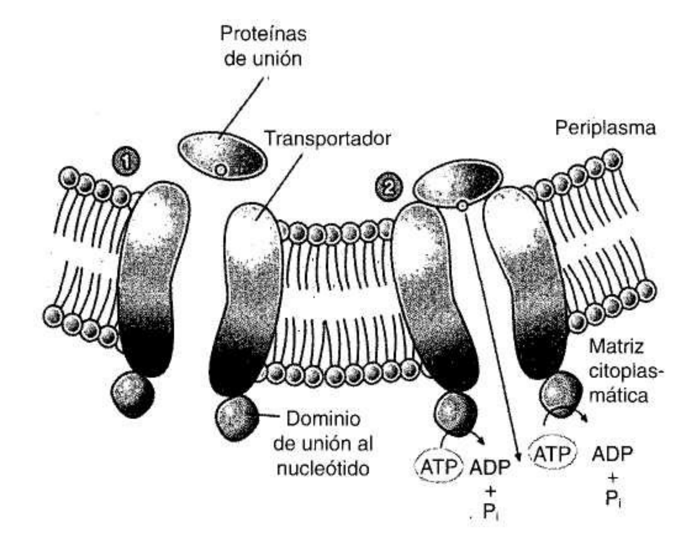
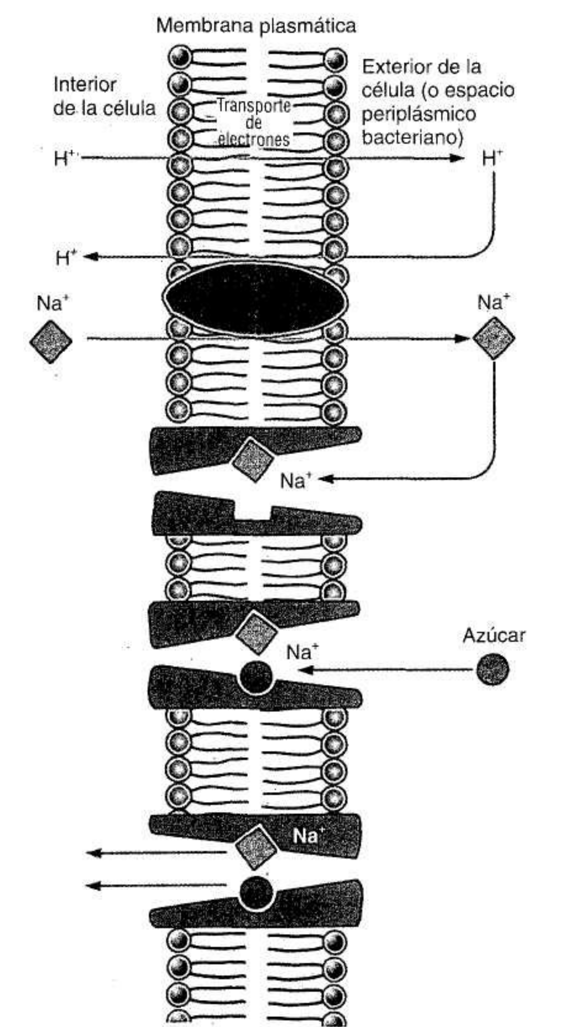


Figura 5.3 Función del transportador ABC. *(1)* La proteína de unión se liga al sustrato transportable y se aproxima al complejo transportador ABC. *(2)* La proteína de unión se une al transportador y libera el sustrato, que se moverá atravesando la membrana con ayuda de la hidrólisis de ATP. Véase el texto para más detalles.

transporte activo. Las proteínas de transporte de membrana responsables de este mecanismo carecen de las anteriores proteínas especiales periplásmicas ligadoras de solutos. La lactosa permeasa de *E. coli* es un ejemplo bien estudiado. La permeasa es una proteína sencilla con un peso molecular de aproximadamente 30 000. Transporta una molécula de lactosa hacia el interior celular, al mismo que tiempo que penetra también un protón (se mantiene en el exterior de la membrana una concentración más elevada de protones por la actividad de la cadena transportadora de electrones). Este sistema de transporte combinado de dos sustancias en la misma dirección se denomina **simporte.** En este caso, la energía almacenada en el protón dirige el transporte del soluto. Aunque el mecanismo de transporte no se conoce completamente, se piensa que la unión del protón a la proteína transportadora cambia su forma y afinidad por el soluto, para que éste pueda ser transportado. *E. coli* utiliza también el sistema de simporte de protones para captar aminoácidos y ácidos orgánicos, como succinato y malato. Hipótesis quimioosmótica (p. 198).

La fuerza motriz de protones puede dirigir indirectamente el transporte activo, a menudo a través de la formación de un gradiente de iones de sodio. Por ejemplo, el sistema de transporte de sodio en *E. coli* bombea sodio hacia el exterior, como respuesta a un movimiento interior de protones **(Figura 5.4).** Este sistema de transporte combinado por el que las sustancias se desplazan en direcciones opuestas se denomina **antiporte.** Posteriormente, el gradiente de sodio generado por este sistema de antiporte de protones dirige la captación de azúcares y aminoácidos. Un ion de sodio puede unirse a una proteína transportadora, cambiando su forma. Luego, esta proteína podría unirse firmemente a un azúcar o aminoácido y orientar sus sitios de unión hacia el interior de la célula. Debido a la baja concentración de sodio intracelular, el ion sodio se disocia del transportador y la otra molécula hace lo mismo. *E. coli* utiliza este sistema para transportar el azúcar melobiosa y el aminoácido glutámico cuando el sodio se desplaza simultáneamente al interior.



1. El transporte de electrones se emplea para bombear protones hacia el exterior de la membrana plasmática.
2. El gradiente de protones dirige la expulsión de iones de sodio mediante un mecanismo antiporte.
3. El sodio se une al complejo proteico transportador.

La conformación del «sitio de unión al soluto» se modifica para unirse a éste (p. ej., un azúcar o aminoácido).

5. La conformación del transportador se altera, de manera que se libera sodio hacia el interior de la célula. Luego, el soluto se separa del transportador (mecanismo simporte).

Figura 5.4 Transporte activo mediado por gradiente de protones y sodio. *(1)* El transporte de electrones se emplea para bombear protones hacia el exterior de la membrana plasmática. (2) El gradiente de protones dirige la expulsión de iones sodio mediante un mecanismo antiporte. (J) El sodio se une al complejo proteico transportador. (4) La conformación del «sitio de unión al soluto» se modifica para unirse a éste (p. ej., un azúcar o aminoácido). (5) A continuación, la conformación del transportador se altera, de manera que se libera sodio hacia el interior de la célula. Luego, el soluto se separa del transportador (mecanismo simporte).

El cotransporte o simporte de sodio es también un proceso importante en las células eucariotas, que lo emplean para captar azúcares y aminoácidos. En lugar de la fuerza motriz de protones, las células eucariotas emplean normalmente el ATP para dirigir el transporte de sodio.

A menudo, un microorganismo presenta más de un sistema de transporte para cada nutriente, como por ejemplo en *E. coli.* Esta bacteria tiene al menos cinco sistemas de transporte para el azúcar galactosa, tres para cada uno de los aminoácidos glutámico y leucina, y dos complejos de transporte de potasio. Cuando existen varios sistemas de transporte para una misma sustancia, los sistemas difieren en propiedades como la fuente de energía, su afinidad por el soluto y la naturaleza de su regulación. Posiblemente, esta diversidad ofrece al microorganismo una ventaja competitiva añadida en un ambiente variable.

Translocación de grupo

En el transporte activo, las moléculas de soluto se desplazan a través de una membrana sin modificarse. Muchos procariotas captan también moléculas mediante **translocación de grupo,** proceso por el cual una molécula es transportada al interior celular después de alterarse químicamente. El sistema de translocación de grupo que mejor se conoce es el dependiente de **fosfoenolpiruvato: sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS,** *sugar phosphotransferase system).* Transporta diversos azúcares al interior de las células procariotas, fosforilándolos mediante fosfoenolpiruvato (PEP) como dador de fosfato.

PEP + azúcar (exterior) —> piruvato + azúcar-P (interior)

El PTS es bastante complejo. En *E. coli* y *Salmonella typhimurium,* está compuesto por dos enzimas y una proteína termoestable de bajo peso molecular (HPr). HPr y la enzima I (El) son citoplasmáticas. La enzima TI (EII) tiene una estructura más variable y está compuesta a menudo por tres subunidades o dominios. EIIA (llamada anteriormente EIII) es citoplasmática y soluble. EIIB es también hidrofílica, pero suele estar unida a EIIC, proteína hidrofóbica que está inmersa en la membrana. Un grupo fosfato de alta energía se transfiere desde el PEP a la enzima II, con la ayuda de la enzima **I** y HPr **(Figura 5.5).** A continuación, se fosforila una molécula de azúcar al atravesar la membrana transportada por la enzima II. La enzima II es muy variable ya que transporta sólo azúcares específicos, mientras que la enzima I y HPr son comunes a todos los PTS.

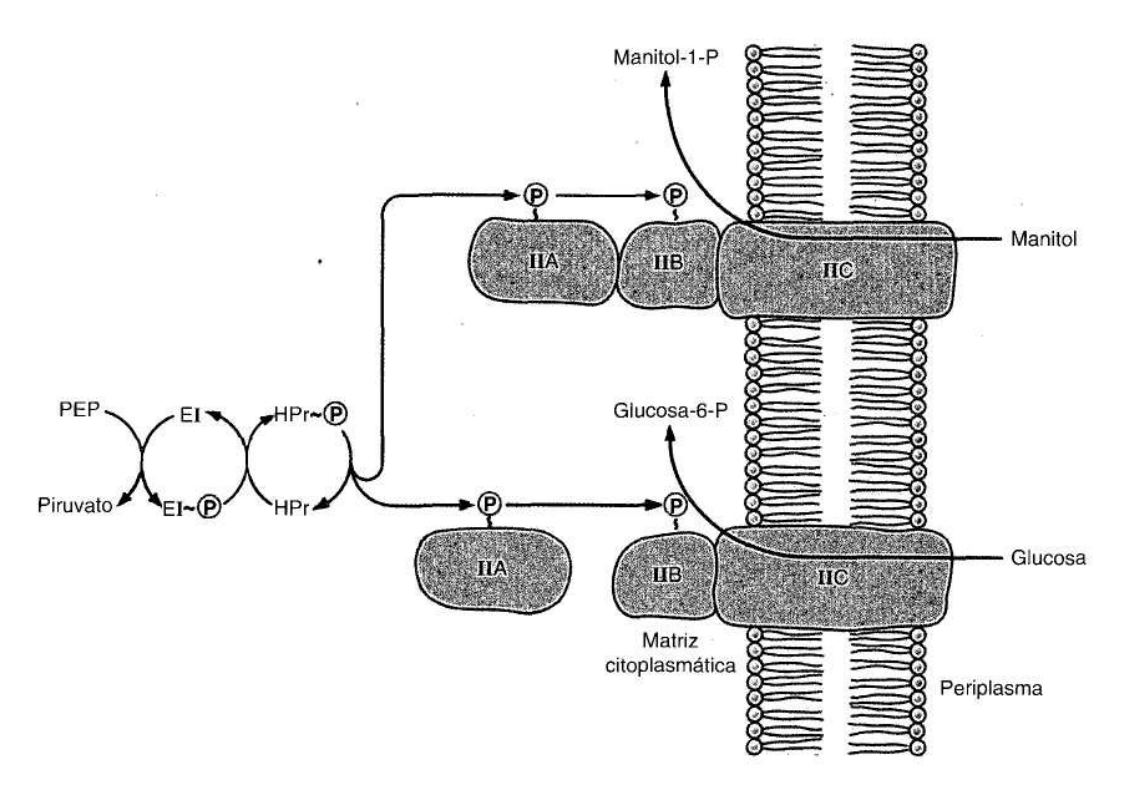


Figura 5.5 Translocación de grupo: transporte PTS bacteriano. Se representan dos ejemplos del sistema de transporte de azúcares mediado por fosfoenolpiruvato (sistema fosfotransferasa, PTS). Los siguientes componentes forman parte del sistema: fosfoenolpiruvato (PEP), enzima I (El), proteína termoestable de bajo peso molecular (HPr) y enzima II (EII). Se transfiere el fosfato de alta energía de HPr a EIIA soluble. EIIA está unida a EIIB en el sistema de transporte de manitol y se separa de EIIB en el sistema de glucosa. En cualquier caso, el fosfato se desplaza de EIIA a EIIB, y luego se transfiere al azúcar durante su transporte a través de la membrana. Se pueden producir otras relaciones entre los componentes de EII. Por ejemplo, HA y IIB pueden formar una proteína soluble separada del complejo de membrana; en este caso, el fosfato sigue desplazándose desde IIA a IIB y, luego, al o a los dominios de membrana.

Los PTS están ampliamente extendidos en procariotas. Las bacterias aerobias carecen de PTS, excepto algunas especies de *Bacillus,* que tienen tanto la glucólisis como los sistemas de fosfotransferasa. Los miembros de los géneros *Escherichia, Salmonella, Staphylococcus* y otras bacterias anaerobias facultativas *{véase la p. 135)* poseen sistemas de fosfotransferasa; algunas bacterias anaerobias obligadas (p. ej., *Clostridium)* también tienen PTS. Muchos hidratos de carbono son transportados por estos mecanismos. *E. coli* capta glucosa, fructosa, manitol, sacarosa, A'-acetilglucosamina, celobiosa y otros hidratos de carbono mediante translocación de grupo. Además de su papel en el transporte, las proteínas de los PTS pueden actuar como quimiorreceptores en la quimiotaxis.

Captación de hierro

Casi todos los microorganismos necesitan hierro para vivir; está presente en citocromos y muchas enzimas. La captación de hierro es difícil debido a la extrema insolubilidad del ion férrico (Fe^{3+}) y de sus derivados, quedando poco hierro libre disponible para su transporte. Muchas bacterias y hongos han superado esta dificultad gracias a la secreción de sideróforos [Griego, transportadores de hierro]. Los **sideróforos** son moléculas de bajo peso molecular capaces de acomplejar hierro férrico y aportarlo a la célula. Estas moléculas transportadoras de hierro son normalmente hidroxamatos o fenolatos-catecolatos. Muchos hongos producen ferricromo (hidroxamato); *E. coli* forma enterobactina (catecolato) **(Figura *5.6a,b*).** Parece que tres grupos sideróforos se acomplejan con orbitales de hierro para formar un complejo octaédrico en seis coordenadas espaciales (Figura 5.6c).

Los microorganismos secretan sideróforos cuando hay poco hierro disponible en el medio. Cuando el complejo hierro-sideróforo ha alcanzado la superficie celular, se une a la proteína receptora del sideróforo. A continuación, el hierro se libera para poder penetrar en la célula directamente, o se transporta al interior todo el complejo hierro-sideróforo mediante un transportador ABC. En *E. coli,* el receptor del sideróforo se localiza en la membrana externa de la envoltura celular; cuando el hierro alcanza el espacio periplásmico, se desplaza a través de la membrana plasmática con la ayuda del transportador. Después de que el hierro ha entrado en la célula, se reduce a la forma ferrosa (Fe $^{+}$). El hierro es tan fundamental para los microorganismos que éstos pueden utilizar más de una vía de captación de hierro para asegurar un aporte adecuado.

1. Describa los conceptos de difusión facilitada, transporte activo y translocación de grupo, en función de sus características y mecanismos distintivos.
2. ¿En qué se diferencian los sistemas de transporte por membranas y los de transporte con proteínas de unión respecto de las fuentes de energía? ¿Qué son los procesos simporte y antiporte?
3. ¿Cómo participan los sideróforos en el transporte de hierro?

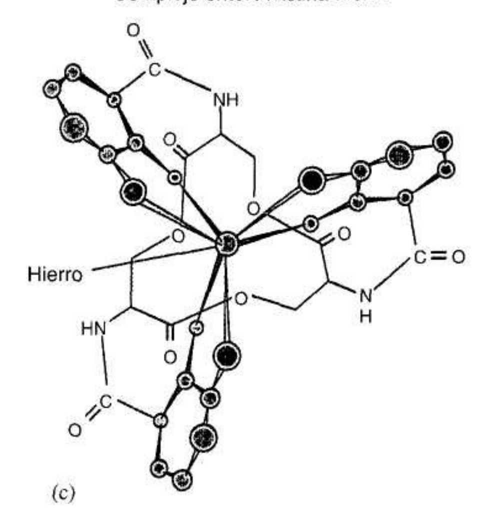


Figura 5.6 **Complejos sideróforo: hierro férrico, (a)** Ferricromo es una molécula de hidroxamato cíclico [—CO—N(CT)—] que producen muchos hongos, (b) *E. coli* elabora el derivado de catecolato cíclico, enterobactina. (c) El hierro férrico se acompleja probablemente con tres grupos sideróforos para formar un complejo octaédrico de seis coordenadas, como se muestra en esta ilustración del complejo enterobactina-hierro.

5.7 Medios de cultivo

Gran parte de los estudios en microbiología depende de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, y esto es sólo posible si se dispone de los medios de cultivo adecuados. Un medio de cultivo es una preparación líquida o sólida utilizada para el crecimiento, transporte, o mantenimiento de microorganismos. Si se desea utilizar para el crecimiento, deberá contener todos los nutrientes esenciales para ese microorganismo concreto. Los medios especiales son imprescindibles para aislar e identificar los microorganismos, evaluar la sensibilidad antibiótica, analizar agua y alimentos, en microbiología industrial y otras actividades. Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales, la composición precisa de un medio adecuado que dependerá de la especie que se quiere cultivar, porque las necesidades nutricionales varían considerablemente. El conocimiento del habitat normal de un microorga-

nismo es a menudo útil para elegir un medio de cultivo apropiado porque sus necesidades de nutrientes reflejan su ambiente natural. Un medio se utiliza frecuentemente para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para facilitar la identificación de una especie en particular. En estos casos, la función de un medio estará también determinada por su composición.

Medios sintéticos o definidos

Algunos microorganismos, particularmente los autotrofos fotolitotrófieos, como las cianobacterias y algas eucariotas, pueden crecer en medios relativamente sencillos, que contienen CO_2 como fuente de carbono (a menudo, incorporado como carbonato o bicarbonato sódico), nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, sulfato, fosfato y diversos minerales **(Tabla 5.4).** Esta clase de medios de la que se conocen todos los componentes se denomina **medio definido** o **medio sintético.** Muchos heterotrofos quimioorganotróficos pueden crecer también en medios definidos con glucosa como fuente de carbono y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. No todos los medios definidos son tan sencillos como los ejemplos que se exponen en la Tabla 5.4, sino que pueden elaborarse a partir de docenas de componentes. Los medios definidos se emplean frecuentemente en investigación, pues a menudo se quiere conocer qué está metabolizando el microorganismo experimental.

Tabla 5.4 Ejemplos de medios definidos

Medio BG-11 para cianobacterias	**Cantidad (g/L)**
$NaNO_3$	1.5
K,HPO_4 • 3H,0	0.04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2$ ■ $2H_2O$	0.036
Ácido cítrico	0.006
Citrato amónico férrico	0.006
EDTA (sal de Na, Mg)	0.001
Na_2CO_3	0.02
Solución de metales traza"	1.OmL/L
pH final de 7.4	
Medio para *Escherichia coli*	**Cantidad (g/L)**
Glucosa	1.0
Na_2HPO_4	16.4
KH_2PO_4	1.5
$(NH_4)_2SO_4$	2.0
$MgSO_4$ ■ 7H,0	200.0 mg
CaCl,	10.0 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 mg
pH final de 6.8 a 7.0	

Fuentes: los datos proceden de Rippka et al., *Journal of General Microbiology,* 111:1-61. 1979; y S. S. Cohén, y R. Arbogast, *Journal of Experimental Medicine,* 91:619, 1950.
* La solución de metales traza contiene H_,BO3, $MnCl_2$ ■ $4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2Mo_4 ■ 2H,O, $CuSO_4$ ■ 5H,0 y $Co(NO_3)_2$ ■ $6H_2O$.

Tabla 5.5 Algunos medios complejos comunes

Caldo nutritivo	**Cantidad (g/L)**
Peptona (hidrolizado de gelatina)	5
Extracto de carne	3
Caldo de triptona y soja	
Triptona (producto digerido pancreático de la caseína)	17
Peptona (producto digerido de semilla de soja)	3
Glucosa	2.5
Cloruro sódico	5
Fosfato dipotásico	2.5
Agar MacConkey	
Producto digerido pancreático de gelatina	17.0
Producto digerido pancreático de caseína	1.5
Producto digerido de tejido animal	1.5
Lactosa	10.0
Sales biliares	1.5
Cloruro sódico	5.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Agar	13.5

Medios complejos

Los medios que contienen algunos ingredientes cuya composición química exacta se desconoce se denominan **medios complejos.** Estos medios son muy útiles, pues un único medio complejo puede ser suficientemente rico para satisfacer las necesidades nutricionales de diversos microorganismos. Además, los medios complejos se necesitan porque a menudo se desconocen las necesidades nutricionales de un microorganismo en particular, por lo que no se puede elaborar un medio definido. Éste es el caso de muchas bacterias exigentes, algunas de las cuales pueden incluso requerir un medio que contenga sangre o suero.

Los medios complejos contienen componentes como peptonas, extracto de carne y de levadura. Las **peptonas** son hidrolizados de proteínas obtenidos de la digestión proteolítica parcial de carne, caseína, harina de soja, gelatina u otras fuentes proteicas. Sirven como fuente de carbono, energía y nitrógeno. Los extractos de carne y de levadura son medios líquidos de carne de vacuno y de levadura de cerveza, respectivamente. El extracto de carne contiene aminoácidos, péptidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales. El extracto de levadura es una fuente excelente de vitaminas del complejo B, y de compuestos de nitrógeno y carbono. Tres medios complejos utilizados comúnmente son 1) caldo nutritivo, 2) caldo de triptona y soja, y 3) agar MacConkey **(Tabla 5.5).**

Si se necesita un medio sólido para cultivar microorganismos en superficie, se puede solidificar un medio líquido añadiendo agar, entre el 1.0 y 2.0 %, normalmente al 1.5 %. El agar es un polímero sulfatado normalmente extraído de algas rojas *(véase la Figura 26.8)* compuesto principalmente

por D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y ácido D-glucurónico **(Recuadro 5.1).** El agar es un buen agente solidificante porque una vez que se funde en agua hirviendo, puede enfriarse hasta una temperatura de 40 a 42 °C, sin endurecerse, y no fundirá de nuevo hasta que no se alcance una temperatura de 80 a 90 °C. El agar es también un agente solidificante excelente porque la mayoría de los microorganismos no pueden degradarlo.

A veces se utilizan otros agentes solidificantes. Por ejemplo, se usa gel de sílice para cultivar bacterias autotrofas en medios sólidos en ausencia de sustancias orgánicas y para definir las fuentes de carbono en bacterias heterotrofas, añadiendo al medio varios compuestos orgánicos.

Tipos de medios

Los medios como el caldo y el agar de triptona y soja se denominan medios para fines generales porque mantienen el crecimiento de muchos microorganismos. La sangre y otros nutrientes especiales se pueden incorporar a estos medios para favorecer el crecimiento de heterotrofos exigentes. Estos medios especiales (p. ej., agar sangre) se denominan medios enriquecidos.

Los **medios selectivos** favorecen el crecimiento de microorganismos particulares. Las sales biliares o colorantes como fucsina básica y cristal violeta favorecen el crecimiento de bacterias Gram negativas, al inhibir el crecimiento de las Gram positivas, sin afectar a las primeras. Los medios «agar endo», «eosina-azul de metileno» y «MacConkey» **(Tabla 5.5),** se emplean extensamente para detectar *E. coli* y bacterias relacionadas en suministros de agua y otros medios, contienen colorantes que suprimen el crecimiento de las bacterias Gram positivas. También se pueden aislar las bacterias incubándolas con nutrientes que puedan utilizar de forma específica. Un medio que contenga celulosa como única fuente de carbono y energía es bastante eficaz para aislar bacterias que digieren celulosa. En definitiva, las posibilidades de diseño de un medio selectivo son innumerables, y existen en el mercado docenas de medios selectivos especiales.

Los **medios diferenciales** son medios que diferencian entre grupos distintos de bacterias e incluso permiten una identificación tentativa de los microorganismos, según sus características biológicas. El agar-sangre es tanto un medio diferencial como un medio enriquecido. Sirve para diferenciar entre bacterias hemolíticas y no hemolíticas. Las bacterias hemolíticas (p. ej., muchos estreptococos y estafilo-

Recuadro 5.1

Descubrimiento del agar como agente solidificante y aislamiento de cultivos puros

Los primeros medios de cultivo eran líquidos, por lo que resultaba enormemente difícil aislar bacterias para preparar cultivos puros. En la práctica, se diluía seriadamente una mezcla de bacterias hasta que sólo quedaba una, como media, en el medio diluido. Si todo se había desarrollado correctamente, la bacteria individual aislada podría producir un cultivo puro. Este método era tedioso, ofrecía resultados variables y tenía numerosos problemas de contaminación. Comprensiblemente, los progresos en el aislamiento de bacterias patogénicas eran muy lentos.

El desarrollo de las técnicas de crecimiento de microorganismos en medios sólidos y de obtención eficaz de cultivos puros se debió al trabajo del bacteriólogo alemán Robert Koch y sus colaboradores. En 1881, Koch publicó un artículo en el que describía el uso de rodajas de patatas hervidas, cortadas con un cuchillo esterilizado a la llama, para cultivar bacterias. Se inoculaban bacterias sobre la rodaja de patata con la punta de una aguja y, luego, las bacterias se extendían de manera que algunas células individuales pudiesen separarse del resto. Las rodajas se incubaban en un recipiente en forma de campana para evitar la contaminación atmosférica, y las células aisladas formaban colonias puras. Sin embargo, muchas bacterias no podían crecer en rodajas de patatas. En la misma época, Frederick Loeffler, colaborador de Koch, desarrolló un medio de peptona-extracto de carne para cultivar bacterias patógenas. Koch decidió intentar solidificar este medio. Koch era fotógrafo aficionado —fue el primero que realizó microfotografías de bacterias— y tenía experiencia en preparar placas fotográficas a partir de sales de plata y gelatina. Precisamente, éste fue el mismo método que utilizó para preparar medios sólidos. Extendió el medio de Loeffler mezclado con gelatina sobre una placa de vidrio, dejándola endurecer, e incubó la superficie de la misma manera que había realizado con las rodajas de patata. El nuevo medio sólido funcionaba bien, pero no podía incubarse a 37 °C (la mejor temperatura de crecimiento para la mayoría de las bacterias patógenas humanas), porque la gelatina se fundía. Además, algunas bacterias la digerían.

Un año después, en 1882, se empleó agar por primera vez como agente solidificante. Había sido descubierto por un posadero japonés, Minora Tarazaemon. Parece ser que este japonés descubrió que el sobrante de una sopa de algas marinas gelificaba tras una noche a la intemperie en las frías noches de invierno. En el este de los Estados Unidos de Norteamérica, el agar era utilizado por los colonos holandeses para preparar jaleas y mermeladas. Fannie Eilshemius Hesse *(véase la Figura 1.5),* nacida en New Jersey y esposa de Walther Hesse, uno de los ayudantes de Koch, había aprendido a utilizar el agar de un amigo holandés, y sugirió su uso al conocer los problemas que tenía el equipo de Koch en la solidificación de medios de cultivo con gelatina. El medio solidificado con agar fue un inmediato éxito y sigue siendo esencial en todas las áreas de microbiología.

cocos aislados de la garganta) producen zonas claras alrededor de sus colonias debido a la lisis de los eritrocitos. El agar MacConkey es tanto diferencial como selectivo. Como contiene lactosa y el colorante rojo neutro, las colonias fermentadoras de la lactosa aparecen de color rosa a rojo y son fácilmente distinguibles de las colonias no fermentadoras.

---

1. Describa los siguientes tipos de medios y sus usos: definidos o sintéticos, complejos, de fines generales, enriquecidos, selectivos y diferenciales. Dé un ejemplo de cada uno.
2. ¿Qué son las peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, y agar? ¿Por qué se utilizan en los medios?

5.8 Aislamiento de cultivos puros

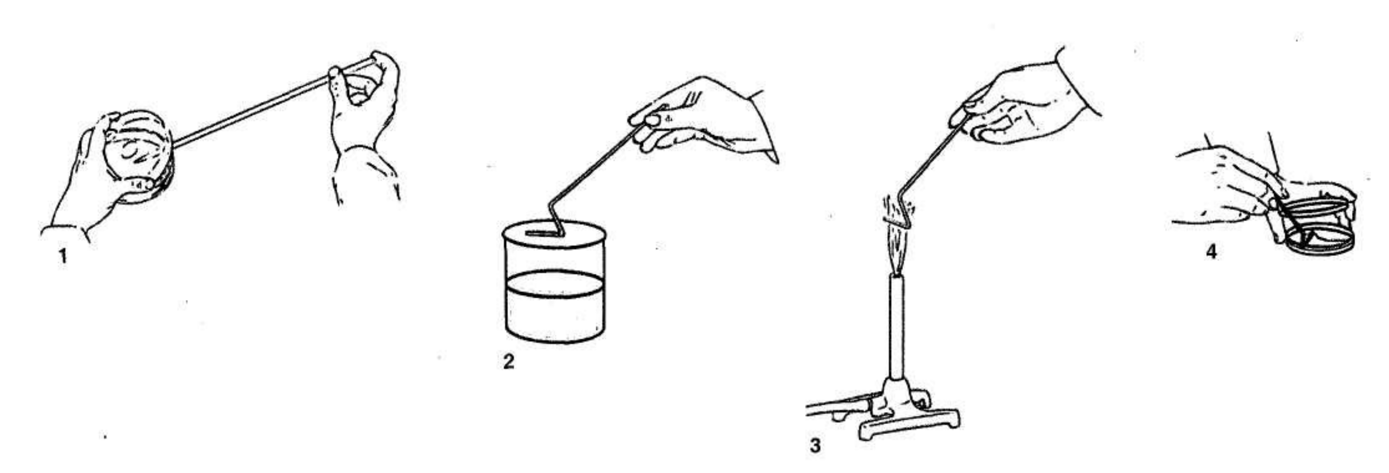
En los habitat naturales, los microorganismos crecen en poblaciones mixtas y complejas, que contienen varias especies. Esto representa un problema para el microbiólogo porque no se puede estudiar adecuadamente un único tipo de microorganismo en un medio mixto. Se necesita un **cultivo puro,** población de células que procede de una única célula, para caracterizar una especie individual. Los cultivos puros son tan importantes, que el desarrollo de las técnicas de cultivos puros por el bacteriólogo alemán Robert Koch transformó la microbiología. En casi 20 años, se aisló la mayoría de los agentes patógenos responsables de las principales enfermedades infecciosas humanas *(véase la Tabla 1.1).* Existen varias formas de preparar cultivos puros; en este capítulo se repasan las más comunes. Breve repaso de algunos hitos principales en microbiología (Capítulo 1).

Siembra en placa por extensión y en estrías

Si se extiende una mezcla de células sobre una superficie de agar, cada célula aislada se multiplicará formando una **colonia** independiente, formación o agrupación macroscópicamente visible de microorganismos sobre un medio sólido; cada colonia representa un cultivo puro. La **siembra por extensión** es una forma directa y fácil de conseguir este resultado. Se pasa un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida conteniendo no más de un centenar de células, al centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie con una varilla acodada de vidrio estéril **(Figura 5.7).** Las células diseminadas sobre la superficie desarrollarán colonias aisladas. El número de colonias debe ser igual al número de organismos viables de la muestra —siempre y cuando el medio y el ambiente de incubación sea el apropiado para la multiplicación de esos microorganismos—. Por ello, este tipo de siembra puede usarse para determinar la concentración microbiana en una muestra. Las colonias aisladas se pueden obtener también mediante **siembra en estrías.** Se inocula la mezcla microbiana sobre un extremo de la placa de agar con un asa de siembra o un hisopo, y se extiende formado estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos **(Figura 5.8).** Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y desarrollarán colonias aisladas **(Figura 5.9).** En ambas técnicas, siembra por extensión y en estrías, un buen aislamiento depende de la separación adecuada de las células individuales. Las colonias que crecen sobre la superficie se pueden utilizar también para inocular un medio fresco y preparar cultivos puros.

Siembra en profundidad

La siembra en profundidad que se emplea frecuentemente con bacterias y hongos, puede también generar colonias aisladas. La muestra original se diluye varias veces para redu-



Flgura 5.7 Técnica de siembra en placa por extensión. Preparación de una siembra por extensión. *(1)* Se toma una muestra pequeña con una pipeta y se coloca en el centro de una placa con agar. (2) Se introduce una varilla acodada de vidrio en un vaso con etanol. *(3)* Se esteriliza esta varilla a la llama y se deja enfriar. (4) Se extiende la muestra uniformemente sobre la superficie de agar con la varilla esterilizada. Se incuba.

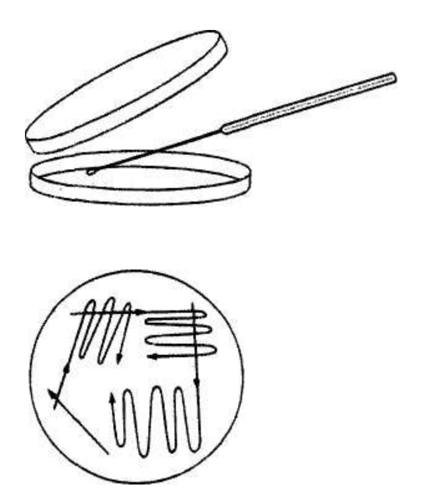


Figura 5.8 Técnica de siembra en estrías. Preparación de siembra en estrías. El dibujo superior muestra una siembra en estrías utilizando un asa de siembra y una placa de Petri con agar. En el dibujo inferior se muestra uno de los patrones que se pueden seguir en la siembra por estrías (aunque el número de estrías por sección debe ser muy superior al indicado).

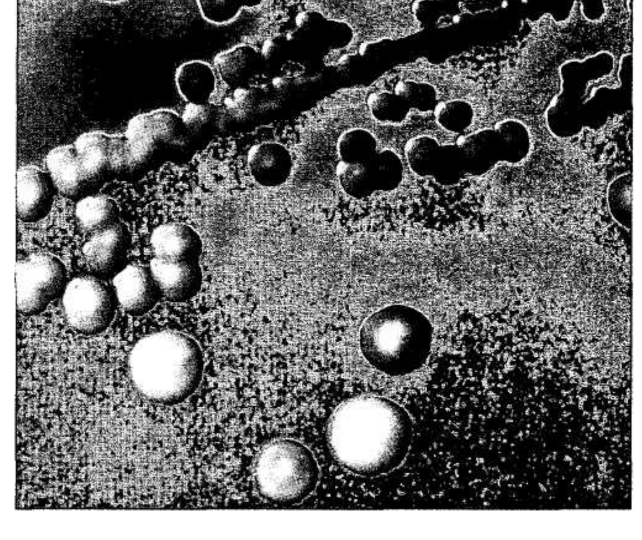


Figura 5.9 Colonias de bacterias sobre agar. Colonias creciendo sobre una placa sembrada por extensión. Se ha inoculado una placa de agar-sangre con *Staphylococcus aureus.* Después de la incubación, se observan grandes colonias doradas sobre el agar.

cir la población microbiana lo suficiente, con el fin de obtener colonias separadas cuando se siembren **(Figura 5.10).** A continuación, se mezclan volúmenes pequeños de las muestras diluidas con agar líquido, que se ha temperado hasta aproximadamente 45 °C, y la mezcla se vierte inmediatamente en placas de cultivo estériles. La mayoría de las bacterias y hongos no se destruye con una exposición breve al agar temperado. Después de endurecerse el agar, cada célula forma una colonia individual. Por motivos estadísticos y de fiabilidad, únicamente se deberán contar las placas conteniendo entre 30 y 300 colonias. De nuevo, el número total de colonias equivale al número de microorganismos viables en la muestra diluida, con la salvedad anteriormente reseñada **(Recuadro 5.2).**

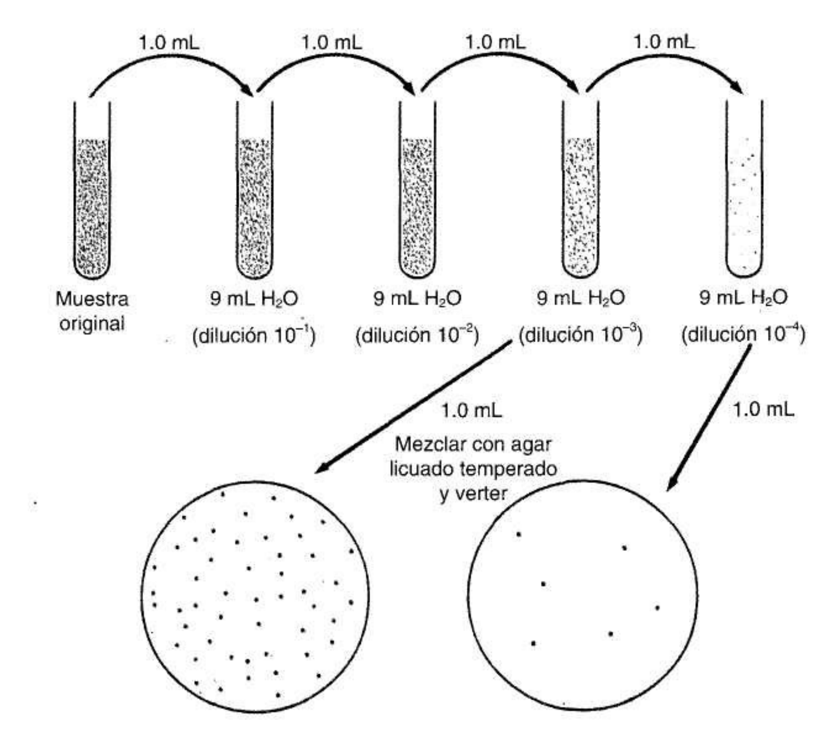


Figura 5.10 Técnica de siembra en profundidad. La muestra original se diluye varias veces para reducir suficientemente la población bacteriana. Luego, se mezclan las muestras más diluidas con agar temperado y se vierte en placas de Petri. Las células aisladas crecen formando colonias, cultivos puros en sí mismas. Las colonias de la superficie son circulares; las situadas por debajo son lenticulares, con forma de lenteja.

Recuadro 5.2

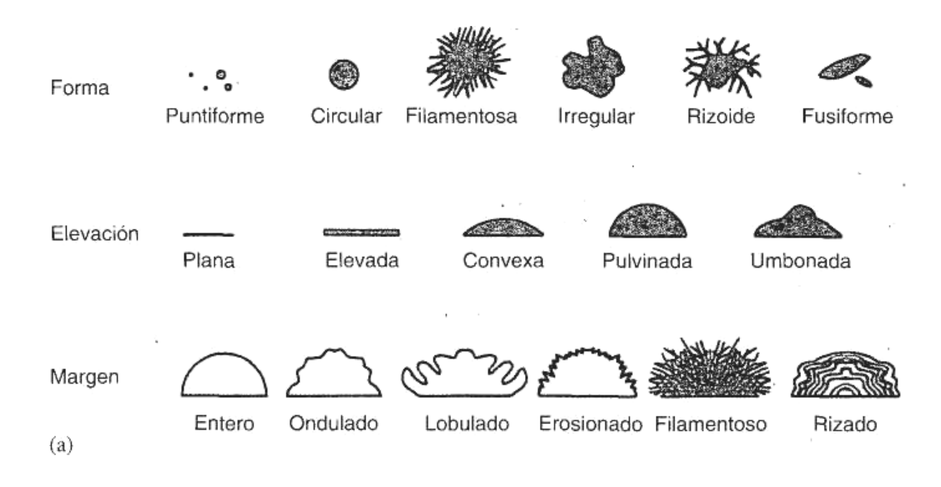
Enriquecimiento y aislamiento de cultivos puros

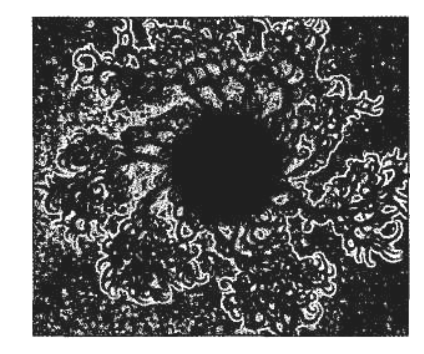
Un problema práctico muy importante es la obtención de cultivos puros cuando los microorganismos se encuentran en una muestra compleja en bajo número. Los métodos de siembra en placa pueden combinarse con el uso de medios selectivos o diferenciales para enriquecer y aislar microorganismos poco frecuentes. Un buen ejemplo es el aislamiento de bacterias que degradan el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se pueden obtener bacterias capaces de metabolizar el 2,4-D con un medio líquido que contenga 2,4-D como única fuente de carbono, más otros componentes necesarios como nitrógeno, fósforo, azufre y minerales. Cuando se inocula este medio con tierra, sólo crecerán las bacterias capaces de degradar 2,4-D. Tras una serie de pases, obtendremos una población enriquecida en bacterias degradadoras de 2,4-D. Los cultivos puros se pueden obtener sembrando esta mezcla en agar que contenga 2,4-D como única fuente de carbono. Sólo las bacterias capaces de crecer con 2,4-D formarán colonias visibles y podrán servir como fuente de cultivo. Este mismo método basado en la selección por características fisiológicas se utiliza para aislar y purificar diversas bacterias.

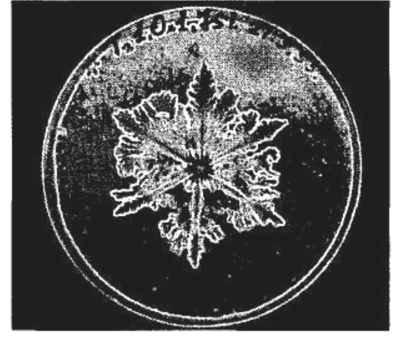
Las técnicas anteriores precisan de placas especiales de cultivo, denominadas **placas de Petri,** en memoria de su inventor, Julius Richard Petri, miembro del laboratorio de Robert Koch; Petri diseñó estas placas hacia 1887 y sustituyeron inmediatamente a los portaobjetos de vidrio cubiertos de agar. Están formadas por dos placas circulares, la parte superior se superpone sobre la inferior (Figura 5.8). Las placas de Petri son muy fáciles de usar, pueden apilarse para ahorrar espacio y constituyen uno de los materiales más comunes de los laboratorios de microbiología.

Morfología y crecimiento de colonias

El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permite al microbiólogo identificar las bacterias porque las especies forman a menudo colonias con una forma y aspecto característico **(Figura 5.11).** Cuando se ha sembrado una población heterogénea de células microbianas, es posible a veces identificar la colonia deseada por su aspecto general y utilizarla para obtener un cultivo puro. La estructura de las colonias bacterianas se ha examinado también con el microscopio electrónico de barrido. La estructura microscópica de las







(b)

Figura 5.11 Morfología de colonias bacterianas, (a) Variaciones en la morfología de las colonias bacterianas observadas a simple vista. Se pueden determinar la forma general de la colonia y del borde o margen mediante vista zenital. El tipo de elevación de ésta se puede apreciar viéndola de lado, manteniendo la placa a la altura de los ojos, (b) La morfología de la colonia puede variar significativamente según el medio en que crezcan las bacterias. Estas preciosas colonias en forma de copos de nieve que se observan en la foto están formadas por *Bacillus subtilis,* que han crecido en un agar pobre en nutrientes. Aparentemente, las bacterias adoptan un comportamiento de cooperación cuando se encuentran en ambientes pobres en nutrientes y, a menudo, el resultado es una estructura intrincada que recuerda a los modelos fractales que se observan en sistemas no vivos.

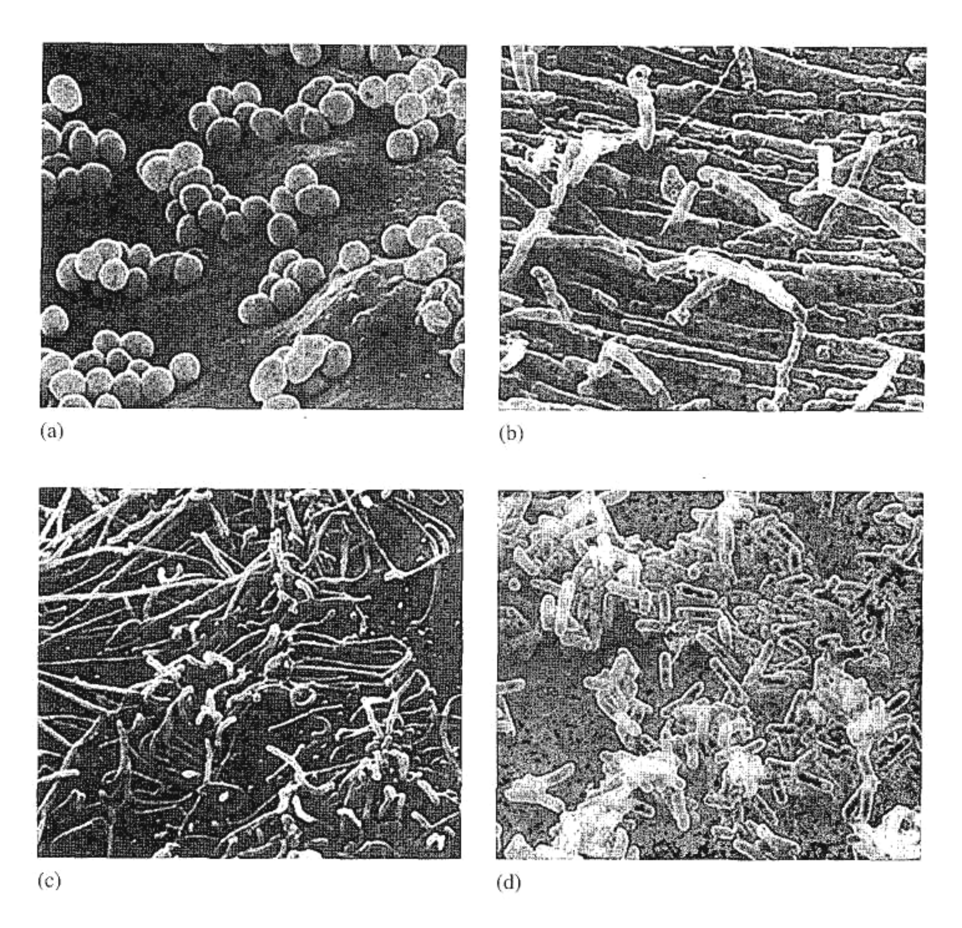


Figura 5.12 Microfotografías electrónicas de barrido de colonias bacterianas, (a) *Micrococcus* sobre agar (x31 000). (b) *Clostridium* (x 12 000). (c) *Mycoplasma pneumoniae* (x26 000). (d) *Escherichia coli* (x 14 000).

colonias es a menudo tan variable como su aspecto visual **(Figura 5.12).**

En la naturaleza, las bacterias y muchos otros microorganismos crecen con frecuencia formando biofilms. Sin embargo, aveces forman discretas colonias. En consecuencia, el conocimiento del crecimiento de las colonias es fundamental para los ecólogos microbianos, por lo que el crecimiento de colonias sobre medios con agar se ha estudiado con interés. En general, el crecimiento celular más rápido se produce en el extremo de la colonia. El crecimiento es más lento en las partes centrales más antiguas de las colonias y, en algunos casos, se llega a producir una autólisis celular en dicha zona. Parece que estas diferencias en el crecimiento se deben a gradientes de oxígeno, nutrientes y productos tóxicos dentro de la colonia. En el extremo de ésta, el oxígeno y los nutrientes son abundantes. El centro de la colonia es, por supuesto, más grueso que el extremo. Por ello, el oxígeno y los nutrientes no difunden tan fácilmente en el centro, los metabolitos tóxicos no pueden eliminarse rápidamente y el crecimiento en esta zona es más lento o está detenido. Debido a estas variaciones ambientales dentro de una colonia, las células de la periferia crecen a un nivel máximo, mientras que las del centro, mueren. Biofilms (pp. 668-670).

Resulta evidente de la Figura 5.11 que algunas bacterias se multiplican sobre superficies sólidas como el agar formando complejas e intrincadas colonias. Estos patrones varían dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y de la dureza del agar. Sin embargo, aún no está claro por qué se desarrollan las peculiares características morfológicas de las colonias. La difusión de nutrientes y su disponibilidad, la quimiotaxia bacteriana, y la presencia de líquido sobre la superficie del agar pueden jugar algún papel en los morfotipos observados. Indudablemente, la comunicación célula-célula y el sistema del *quorum sensing {véanse las pp. 141-142)* es igualmente muy importante. Aún queda mucho trabajo por realizar para conocer la formación de las colonias bacterianas y los biofilms.

---

1. ¿Qué son los cultivos puros y por qué son tan importantes? ¿Cómo se preparan los cultivos en placa mediante siembra por extensión, en estrías, y en profundidad?
2. ¿De qué forma el crecimiento microbiano varía dentro de una colonia? ¿Qué factores pueden causar estas variaciones en el crecimiento?

Resumen

1. Los microorganismos precisan nutrientes, materiales que se utilizan en la biosíntesis y en la producción de energía.
2. Los macronutrientes o macroelementos (C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg y Fe) se necesitan en grandes cantidades; micronutrientes o elementos traza (p. ej., Mn, Zn, Co, Mo, Ni y Cu) se utilizan en cantidades muy pequeñas.
3. Los autolrofos utilizan CO_2 como fuente principal o única de carbono; los heterotrofos emplean moléculas orgánicas.
4. Los microorganismos se pueden clasificar según sus fuentes de energía y de electrones **(Tabla 5.1).** Los fototrofos utilizan la energía lumínica y los quimiotrofos obtienen energía de la oxidación de compuestos químicos. Los litotrofos liberan electrones de sustancias inorgánicas reducidas, y los organotrofos, de compuestos orgánicos **(Tabla 5.2).**
5. Nitrógeno, fósforo y azufre pueden obtenerse: 1) a partir de las mismas moléculas orgánicas que aportan carbono; 2) por incorporación directa de amonio y fosfato; y 3) por reducción y asimilación de moléculas inorgánicas oxidadas.
6. Probablemente, la mayoría de los microorganismos necesitan factores de crecimiento para su multiplicación. Este requerimiento es el fundamento de los bioensayos microbiológicos.
7. Aunque algunos nutrientes pueden entrar en la célula por difusión pasiva, normalmente se requiere una proteína transportadora de membrana.
8. En la difusión facilitada, la proteína transportadora traslada una molécula a través de la membrana, a favor de gradiente de concentración, por lo que no se precisa aporte de energía **(Figura 5.2).**
9. Los sistemas de transporte activo emplean energía metabólica y proteínas transportadoras de membrana para concentrar las sustancias activamente, transportándolas en contra de un gradiente. Los transportadores ABC utilizan ATP como fuente de energía **(Figura 5.3).** Gradientes de protones e iones sodio pueden también facilitar el transporte de solutos a través de las membranas **(Figura 5.4).**
10. Las bacterias transportan también moléculas orgánicas modificándolas, proceso que se conoce como translocación de grupo. Por ejemplo, muchos azúcares son transportados y fosforilados simultáneamente **(Figura 5.5).**
11. El hierro se acumula por medio de la secreción de sideróforos, moléculas pequeñas capaces de acomplejar hierro férrico **(Figura 5.6).** Cuando el complejo hierro-sideróforo alcanza la superficie celular, es transportado hacia su interior y el hierro se reduce a la forma ferrosa.
12. Los medios de cultivo se pueden elaborar completamente a partir de componentes definidos químicamente (medios definidos o sintéticos) o pueden contener constituyentes como peptonas y extracto de levadura, cuya composición exacta se desconoce (medios complejos).
13. Un medio de cultivo se puede solidificar añadiéndole agar, polisacárido complejo producido por algas rojas.
14. Los medios de cultivo se clasifican según su función y composición en: medios con fines generales, enriquecidos, selectivos y diferenciales.
15. Los cultivos puros se pueden obtener normalmente aislando células individuales con cualquiera de las tres técnicas de siembra en placa: por extensión, en estrías y en profundidad **(Figuras 5.7** y **5.8).**
16. Los microorganismos que crecen sobre superficies sólidas tienden a formar colonias con una morfología distintiva. Dentro de cada colonia, los microorganismos crecen normalmente con mayor rapidez en los extremos, donde las cantidades de recursos disponibles son mayores.

Palabras clave

agar *110*
antiporte *107*
autotrofo quimiolitotrófico *102* autotrofo
101 autotrofo fotolitotrófico *101* colonia
112 cultivo puro *112* difusión facilitada
105 difusión pasiva *104* elementos traza
700 factores de crecimiento *103*
fosfoenolpiruvaro: sistema fosfotransferasa
de azúcares (PTS) *108*
fotoautotrofo *101*
fototrofo *101*
heterotrofo fotoorganotrófico *102*
heterotrofo quimioorganotrófico *101*
heterotrofos *101*
litotrofos *101*
macroelementos *100*
medio complejo *110*
medio definido *110*
medio diferencial *111*
medio sintético *110*
medios selectivos *111*
micronutrientes *100*
mixotrofo *102*
nutriente *100*
organotrofo *101*
peptonas *110*
permeasa *105* placa de Petri
¡14 quimioheterotrofo *101*
quimiotrofo *101* sideróforos
109 siembra en estrías *112*
siembra en profundidad *112*
siembra por extensión */12*
simporte *107*
tranportadores ABC *(ATP-binding cassette)* *106* translocación
de grupo *108* transporte activo
106 vitaminas *103*

Preguntas para razonar y repasar

1. ¿Por qué es tan difícil demostrar las necesidades de micronutrientes en los ni icroorganismos?
2. Enumere algunos de los usos más importantes del nitrógeno, fósforo y azufre que los microorganismos obtienen de su entorno.
3. ¿Por qué los aminoácidos, purinas y pirimidinas son a menudo factores de crecimiento, a diferencia de la glucosa?
4. ¿Por qué los microorganismos captan habitualmente nutrientes mediante proteínas transportadoras o permeasas? ¿Qué ventaja obtiene un microorganismo cuando utiliza el transporte activo en lugar de la difusión facilitada?
5. Cómo procedería para obtener un cultivo puro de bacterias que pudiesen degradar benceno y lo utilizaran como fuente de carbono y energía.
6. Describa las necesidades nutricionales de un heterotrofo quimiolitotrófico. ¿En qué ambientes podría encontrar este tipo de bacteria?
7. Suponga que realiza una serie de diluciones seriadas con muestras de 0.1 mL como se muestra en la Figura 5.10. De la placa 1CT[1] se obtienen 80 colonias, y de la placa 10"[4], 4 colonias. Calcule la concentración (bacterias formadoras de colonias/mL) de la muestra original no diluida.

Cuestiones para reflexionar

1. Discuta las ventajas y desventajas que supone para el huésped la translocación de grupo respecto a la endocitosis.
2. Explique por qué en ocasiones no resulta exitoso el aislamiento de un cultivo puro sobre un medio selectivo sólido.

Lecturas suplementarias

General

Conn, H. J., editor. 1957. *Manual of microbiological methods.* New York: McGraw-Hill. Gottschall, J. C; Harder, W.; and Prins, R. A. 1992. Principies of cnrichmenl, isolation, cultivation, and preservation of bacteria, [n *The prokaryotes.* 2d ed.. A. Balows et al., editors, 149-96. New York: Springer-Vcrlag. Holt, J. G., and Krieg, N. R. 1994. Enrichment and isolation. In *Methods for general and molecular bacteriólogo,* 2d ed., P. Gcrhardt, editor, 179-215. Washington, D.C.: American Socicty lor Microbiology. Neidhardt, F. C; Ingraham. J. L.; and Schaechter, M. 1990. *Physiology ofthe bacterial cell: A molecular approeich.* Simderland. Mass.: Sinauer.

Whittenbury, R. 1978. Bacterial nutrition. In *Essays in microbiology,* J. R. Norris and M. H. Richmond, editors, 16/1-16/32. New York: John Wiley and Sons.

5.3 Tipos nutricionales entre los microorganismos

Kelly, D. P. 1992. The chemolithotrophic prokaryotes. In *The prokaryotes,* 2d ed., A. Balows et al., editors, 331-43. New York: Springer-Verlag.

Whittenbury, R., and Kelly, D. P. 1977. Autotrophy: A conceptual phoenix. In *Microbial energelics,* B. A. Haddock and W. A. Hamilton, editors, 121-49. New York: Cambridge University Press.

5.6 Captación celular de nutrientes

Ames, G. F.-L.; Mimura, C. S.; Holbrook, S. R.; and Shyamala, V. 1992. Trafile ATPases: A superfamily of Iransport proteins operating íroni *E. coli* lo humans. *Adv. Eniymol.* 65:1-47. Braun, V. 1985. The unusual features ofthe iron transpon systems *oí Escherichia cofi. Trends Biochem. Sci.* IO(2):75-78. Dassa, E. 2000. ABC transpon. In *Encyclopedia of microbiology* 2d cd., vol. I, J. Lederberg, editor-in-chief, 1-12. San Diego: Academic Press. Doige, C. A., and Ames, G. F.-L. 1993. ATP-dependent transpon systems in bacteria and humans: Relcvance lo cystic flbrosis and multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:291-319. Earhart, C. F. 2000. Iron inetabolism. In *Encyclopedia of microbiology,* 2d ed., vol 2, J. Lederberg, edilor-in-chief, 860-68. San Diego: Academic Press. Harder, W., and Dijkhuizen, L. 1983. Physiological responses lo nutrient limitation. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:1-23. Hohmann, S.; Bill, R. M.; Kayingo, G.; and Prior, B. A. 2000. Microbial M1P channels. *Trends Microbiol.* 8(l):33-38. Maloney, P. C; Ambudkar, S. V.; Anantharam, V.; Sonna, L. A.; and Varadhachary, A. 1990. Anion-exchange mechanisms in bacteria. *Microbiol. Rev.* **54(1): 1-17.** Meadow, N. D.; Fox, D. K.; and Roseman, S. 1990. The bacterial phosphoenolpyruvate: glycose phosphotransferasc system. *Aun. Rev. Biochem.* 59:497-542. Neilands, J. B. 1991. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50:715-31.

Postma, P. W.; Lengeler, J. W.; and Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57(3):543-94.

5.7 Medios de cultivo

Atlas, R. M. 1997. *Handbook of microbiological media,* 2d ed. Boca Ratón, Fia.: CRC Press.

Bridson, E. Y. 1990. Media in microbiology. *Rev. Med. Microbiol.* 1:1-9. Cote, R. J., and Ghema, R. L. 1994. Nutrition and media. In *Methods for general and molecular bacteriology,* 2d ed., P. Gerhardt, editor, 155-78. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. Difco Laboratories. 1998. *Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiology.* 1 lth ed. Sparks, Md.: BD Bioscience. Power, D. A., editor. 1988. *Manual ofBBL producís and laboratory procedures.* **6th** ed. Cockeysville, Md.: Becton, Dickinson and Company.

5.8 Aislamiento de cultivos puros

Gutnick, D. L., and Ben-Jacob, E. 1999. Complex patlern formation and cooperative organizatíon of bacterial colonies. In *Microbial ecology and infectious disease,* E. Rosenberg, editor, 284-99. Washington, D.C.: ASM Press.

Schindler, J. 1993. Dynamics of *Bacillus* colony growth. *Trends Microbiol.* I(9):333-38.

Shapiro, J. A. 1988. Bacteria as multicellular organisms. *Sci. Am.* 258(6):82-89.